

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representation of
The original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

THIS PAGE BLANK (USPTO)



Amendement A7u2
(2)

7

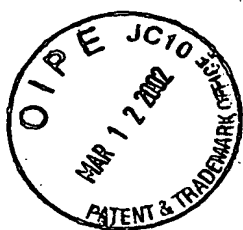
10/02 3,476

AV 1638

BREVET D'INVENTION

Mcconan

CERTIFICAT D'UTILITÉ - CERTIFICAT D'ADDITION



COPIE OFFICIELLE

Le Directeur général de l'Institut national de la propriété industrielle certifie que le document ci-annexé est la copie certifiée conforme d'une demande de titre de propriété industrielle déposée à l'Institut.

Fait à Paris, le 08 FEV. 2002

Pour le Directeur général de l'Institut
national de la propriété industrielle
Le Chef du Département des brevets

Martine PLANCHE

INSTITUT
NATIONAL DE
LA PROPRIÉTÉ
INDUSTRIELLE

SIEGE
26 bis, rue de Saint Petersbourg
75800 PARIS cedex 08
Téléphone : 33 (1) 53 04 53 04
Télécopie : 33 (1) 42 93 59 30
www.inpi.fr

THIS PAGE BLANK (USPTO)

REQUÊTE EN DÉLIVRANCE

26 bis, rue de Saint Pétersbourg
75800 Paris Cedex 08
Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

Confirmation d'un dépôt par télécopie ☐

Cet imprimé est à remplir à l'encre noire en lettres capitales

Reservé à l'INPI

DATE DE REMISE DES PIÈCES **21 JUIN 1999**
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL **9907834**
DEPARTEMENT DE DÉPÔT **75** **75 INPI PARIS**
DATE DE DÉPÔT **21 JUIN 1999**

1 **NOM ET ADRESSE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE
À QUI LA CORRESPONDANCE DOIT ÊTRE ADRESSÉE**

**Cabinet ARMENGAUD AINE
3, Avenue Bugeaud
75116 PARIS**

2 **DEMANDE Nature du titre de propriété industrielle**

☒ brevet d'invention

☐ demande divisionnaire

☐ certificat d'utilité

☐ transformation d'une demande
de brevet européen



demande initiale

☐ brevet d'invention

n° du pouvoir permanent

références du correspondant

téléphone

D.59783

01-45-53-05-50

☐ certificat d'utilité n°

date

Établissement du rapport de recherche

☐ différé

☒ **immédiat**

Le demandeur, personne physique, requiert le paiement échelonné de la redevance

☐ oui

☒ **non**

Titre de l'invention (200 caractères maximum)

**"Moyens pour l'identification du locus d'un gène majeur de la résistance au virus
de la panachure jaune du riz et leurs applications"**

3 **DEMANDEUR (S)** n° SIREN

code APE-NAF

Nom et prénoms (souligner le nom patronymique) ou dénomination

Forme juridique

1) **INSTITUT DE RECHERCHE POUR LE DEVELOPPEMENT (I.R.D.)**

2) **ASSOCIATION POUR LE DEVELOPPEMENT DE LA RIZICULTURE
EN AFRIQUE DE L'OUEST (ADRAO)**

Nationalité (s) 1) **Française**

2) **Ivoirienne**

Adresse (s) complète (s)

Pays

1) **213 Rue La Fayette
75480 PARIS CEDEX 10**

1) **FRANCE**

2) **01 B.P. 2551
Bouaké 01.**

2) **COTE D'IVOIRE**

En cas d'insuffisance de place, poursuivre sur papier libre ☐

4 **INVENTEUR (S)** Les inventeurs sont les demandeurs

☐ oui

☒ **non**

Si la réponse est non, fournir une désignation séparée

5 **RÉDUCTION DU TAUX DES REDEVANCES**

☐ requise pour la 1ère fois

☐ requise antérieurement au dépôt ; joindre copie de la décision d'admission

6 **DÉCLARATION DE PRIORITÉ OU REQUÊTE DU BÉNÉFICE DE LA DATE DE DÉPÔT D'UNE DEMANDE ANTÉRIEURE**

pays d'origine

numéro

date de dépôt

nature de la demande

7 **DIVISIONS** antérieures à la présente demande n°

date

n°

date

8 **SIGNATURE DU DEMANDEUR OU DU MANDATAIRE**
(nom et qualité du signataire)

Mandataire : Chantal PEAUCELLE
n° 92-1189

Chantal Peaucelle

SIGNATURE DU PRÉPOSÉ À LA RÉCEPTION

SIGNATURE APRÈS ENREGISTREMENT DE LA DEMANDE À L'INPI

[Signature]

DÉPARTEMENT DES BREVETS

26 bis, rue de Saint Pétersbourg

75800 Paris Cedex 08


Téléphone : 01 53 04 53 04 Télécopie : 01 42 93 59 30

DÉSIGNATION D'INVENTEUR(S) Page N° 1. / 1.

(Si le demandeur n'est pas l'inventeur ou l'unique inventeur)

Cet imprimé est à remplir lisiblement à l'encre noire

DB 113 W / 260899

V s références pour ce dossier (facultatif)		CP/AC 59.783-926	
N° D'ENREGISTREMENT NATIONAL		99 07 834	
TITRE DE L'INVENTION (200 caractères ou espaces maximum)			
Moyens pour l'identification du locus d'un gène majeur de la résistance au virus de la panachure jaune du riz et leurs applications"			
LE(S) DEMANDEUR(S) :			
I.R.D. et ADRAO			
DESIGNE(NT) EN TANT QU'INVENTEUR(S) : (Indiquez en haut à droite «Page N° 1/1» S'il y a plus de trois inventeurs, utilisez un formulaire identique et numérotez chaque page en indiquant le nombre total de pages).			
Nom		GHESQUIERE	
Prénoms		Alain	
Adresse	Rue	1275 rue de la Roqueturière	
	Code postal et ville	34000	MONTPELLIER
Société d'appartenance (facultatif)			
Nom		ALBAR	
Prénoms		Laurence	
Adresse	Rue	13 Avenue des Pyrénées	
	Code postal et ville	31280	MONS
Société d'appartenance (facultatif)			
Nom			
Prénoms			
Adresse	Rue		
	Code postal et ville		
Société d'appartenance (facultatif)			
DATE ET SIGNATURE(S) DU (DES) DEMANDEUR(S) OU DU MANDATAIRE (Nom et qualité du signataire) Mandataire : Chantal PEACELLE n° 92-1189 Le 26 juillet 2001			

Moyens pour l'identification du locus d'un gène majeur de la résistance au virus de la panachure jaune du riz et leurs applications.

5 L'invention a pour objet des moyens, outils et procédés, pour l'identification du locus d'un gène majeur de résistance au virus de la panachure jaune du riz (en abrégé RYMV pour Rice Yellow Mottle Virus). Elle vise plus spécialement, en tant qu'outils, des marqueurs et des amorces PCR.

10 RYMV est un virus endémique en Afrique. Chez quelques rares variétés de l'espèce africaine de riz cultivé *Oryza glaberrima*, une résistance très élevée au RYMV a été identifiée. Mais comme les hybrides interspécifiques entre les deux espèces de riz cultivées
15 sont extrêmement stériles, les recherches antérieures n'ont pas permis de décrire de bases génétiques, ni de mécanisme de cette résistance.

Les travaux des inventeurs dans ce domaine ont montré qu'une variété dénommée *Gigante*, originaire du
20 Mozambique et identifiée par l'ADRAO, de l'espèce asiatique de riz cultivé *Oryza sativa*, manifestait les mêmes caractéristiques que celles observées chez *O. glaberrima*. Les inventeurs ont caractérisé la résistance à RYMV en mettant en évidence qu'elle est liée à un gène
25 majeur de résistance récessif et identique chez les deux

sources de résistance considérée (*O. Sativa* et *O. glaberrima*).

Cette résistance intervient au niveau du mouvement de cellule à cellule et se traduit par un blocage du virus au niveau des cellules infectées alors que la réplication du virus est normale. La migration du RYMV se fait sous forme d'un complexe nucléoprotéique associant acide nucléique viral, protéine de la capsid et protéine du mouvement du virus. Chez la plante, un facteur cellulaire, probablement une protéine, contribue également au déplacement du virus dans les cellules des variétés sensibles. Chez les variétés résistantes au contraire, une mutation de cette protéine ne permet plus l'association avec le virus et donc sa diffusion dans la plante.

Compte tenu de ces résultats, les inventeurs ont élaboré une méthode et des outils spécifiques pour identifier ce gène de résistance au RYMV qui code pour cette protéine permettant d'assurer le mouvement du virus dans la plante.

L'invention a donc pour but de fournir un procédé pour l'identification des marqueurs moléculaires du locus de résistance au RYMV.

Elle vise également, en tant que tels, les fragments d'ADN tels que révélés par ce procédé, et utilisables en tant que marqueurs.

L'invention vise en outre les applications de tels marqueurs, notamment pour définir d'autres marqueurs de haute spécificité vis-à-vis du locus de résistance et pour prédire un phénotype résistant.

5 L'invention vise encore, en tant que nouveaux produits, les séquences des amorces utilisées dans les techniques PCR mises en oeuvre.

Conformément à l'invention, l'identification de marqueurs du locus d'un gène majeur de résistance à YMV,
10 comprend l'utilisation de marqueurs AFLP (Amplified Fragments Length Polymorphism) et fait appel à la technique PCR.

Ce procédé d'identification est caractérisé en ce qu'il comprend

15 - l'amplification sélective de fragments d'ADN de riz d'une part d'individus résistants, d'autre part d'individus sensibles, descendant de variétés parentales, ces fragments ayant été préalablement soumis à une étape de digestion, puis de ligation pour fixer des adaptateurs
20 complémentaires d'amorces ayant, à leur extrémité, un ou plusieurs nucléotides spécifiques, l'une des amorces du couple étant marquée aux fins de révélation,

- la séparation des produits d'amplification, par électrophorèse sur gel dans des conditions
25 dénaturantes, et

- la comparaison des profils d'électrophorèse obtenus avec des mélanges de fragments issus de descendants résistants et des mélanges issus de descendants sensibles, avec les fragments provenant des variétés parentales, aux fins d'identification de bandes dont le polymorphisme est génétiquement lié au locus de résistance, cette identification étant suivie le cas échéant, à titre de validation, d'une vérification sur chacun des individus et du calcul du taux de recombinaison génétique entre le marqueur et le locus de résistance.

Dans un mode de réalisation de l'invention, les fragments d'ADN sont obtenus par digestion des ADN génomiques de plantes résistantes d'une part, et de plantes sensibles d'autre part, et de leurs parents, à l'aide d'enzymes de restriction.

Des enzymes de restriction qui se sont révélées appropriées comprennent EcoRI et MseI.

De courtes séquences nucléotidiques sont fixées aux fragments de digestion (adaptateurs) pour générer des extrémités franches auxquelles sont ensuite fixés des adaptateurs.

Les amorces utilisées dans l'étape d'amplification sont complémentaires de ces adaptateurs avec, à leur extrémité 3', de 1 à 3 nucléotides qui peuvent être variables.

L'étape d'amplification est conduite avantageusement selon la technique PCR.

Des profils d'amplification spécifiques sont obtenus avec des couples d'amorces possédant à leur
5 extrémité, respectivement, des motifs AAC et CAG, ACC et CAG, ou encore AGC et CAG.

Les séquences correspondant aux adaptateurs EcoRI et MseI sont respectivement GAC TGC GTA CCA ATT C (SEQ ID N°1) et GAT GAG TCC TGA GTA A (SEQ ID N° 2).

10 Les couples d'amorces mis en oeuvre pour l'amplification sont alors avantageusement choisis parmi E-AAC/M-CAG ; E-ACC/M-CAG ; et E-AGC/M-CAG ; dans lesquels E et M correspondent respectivement à SEQ ID N° 1 et SEQ ID N°2.

15 L'étude comparative des profils d'amplification obtenus permet de révéler des bandes polymorphes spécifiquement présentes chez les variétés parentales sensibles et leurs descendants sensibles, comme exposé
20 dans les exemples, et correspondant en conséquence à des marqueurs de résistance.

En particulier, la révélation sur gel d'électrophorèse en conditions dénaturantes conduit à
25 l'identification de 2 bandes marqueurs M1 et M2 respectivement de 510 pb et 140 pb.

Ces 2 bandes déterminent après l'analyse des données de ségrégation un segment chromosomique de 10 à 15 cM portant le locus de résistance et sont situées de part et d'autre de ce locus, à 5-10 cM.

5 Selon une disposition du procédé de l'invention, les bandes polymorphes identifiées en tant que marqueurs spécifiques du locus de la résistance au RYMV sont isolées à partir des gels. On opère avantageusement par excision des gels d'électrophorèse.
10 Cette étape d'isolement est suivie d'une purification en procédant selon les techniques classiques. On dispose ainsi de fragments d'ADN.

 Selon une autre disposition de l'invention, lesdits fragments purifiés sont clonés dans un vecteur
15 approprié, tel qu'un plasmide, introduit dans des cellules hôtes, notamment des cellules bactériennes comme celles de *E. coli*.

 Selon encore une autre disposition de l'invention, les fragments d'ADN purifiés et clonés sont
20 séquencés.

 Mettant à profit les séquences des inserts correspondant auxdits fragments d'ADN, l'invention fournit également un procédé d'obtention de marqueurs de grande spécificité vis-à-vis du locus d'un gène majeur de
25 résistance au RYMV. Ce procédé est caractérisé en ce qu'on définit des couples d'amorces PCR complémentaires d'une partie de la séquence du fragment d'ADN qui a été séquencé, on procède à une amplification spécifique de ce fragment à l'aide de ces couples d'amorces, puis on

soumet les produits d'amplification à une migration sur gel d'électrophorèse.

Ces séquences d'ADN sont utilisables pour identifier un polymorphisme lié au locus de résistance dans une variété à étudier suivant différents procédés ainsi que décrit dans les exemples :

1) en identifiant directement un polymorphisme de taille de ces séquences d'ADN après amplification spécifique et séparation des fragments sur gel d'agarose,

2) en digérant les produits d'amplification par des enzymes de restriction pour séparer les produits de digestion sur gel d'agarose,

3) en utilisant ces séquences comme des sondes pour hybrider l'ADN de variétés de riz préalablement digérées par une enzyme de restriction et déterminer un polymorphisme de restriction.

L'invention vise, en tant que nouveaux produits, les bandes AFLP polymorphes telles qu'identifiées par le procédé défini ci-dessus, à partir d'ADN de plantes de riz, et le cas échéant isolées, purifiées et séquencées.

Ces bandes AFLP sont caractérisées en ce qu'elles sont spécifiquement mises en évidence dans une

variété sensible au RYMV (IR64) et dans la fraction de plantes sensibles issues du croisement de cette variété avec la variété résistance Gigante comme décrit dans les exemples.

5

L'invention vise tout spécialement les séquences d'ADN correspondant à ces bandes polymorphes, et qui permettent de définir un segment du chromosome 4 de 10-15 cM portant le locus de résistance au RYMV.

10

Compte tenu de leur procédé d'obtention, les bandes AFLP correspondent à des fragments de restriction et en particulier, conformément à un mode de réalisation du procédé de l'invention, à des fragments EcoRI - MseI.

15

Des fragments de ce type sont appelés marqueurs M1 et M2 et sont caractérisés par une taille, respectivement, de 510 pb et de 140 pb en gel d'électrophorèse en conditions dénaturantes.

20

Ces fragments sont caractérisés en ce qu'ils correspondent à des séquences d'ADN flanquant le locus de résistance et situés de part et d'autre de ce dernier à 5-10 cM.

25

L'invention vise également des fragments clonés dans des vecteurs tels que plasmides, ces vecteurs de clonage en tant que tels, caractérisés par le fait qu'ils comportent de tels fragments, et les cellules hôtes

transformées à l'aide de ces vecteurs, tels que des cellules bactériennes comme *E. coli*.

L'invention vise notamment la séquence d'ADN correspondant au fragment identifié comme marqueur M1, et
 5 répondant à la séquence SEQ ID N° 3 suivante :

CGTGCTTGCTTATAGCACTACAGGAGAAGGAAGGGGAACACAACAGCCATGGCGAGC
 GAAGGTTCAACGTCGGAGAAACAGGCTGCGACGGGCAGCAAGGTGCCGCGGCGGAT
 CGGAGGAAGGAAAAGGAGGAAATCGAAGTTATGCTGGAGGGGCTTGACCTAAGGGCA
 10 GATGAGGAGGAGGATGTGGAATTGGAGGAAGATCTAGAGGAGCTTGAGGCAGATGCA
 AGATGGCTAGCCCTAGCCACAGTTCATACGAAGCGATCGTTTAGTCAAGGGGCTTTC
 TTTGGGAGTATGCGCTCAGCATGGAAGTGCAGGAAAGAAGTAGATTTTCAGAGCAATG
 AAAGACAATCTGTTCTCGATCCAATTCAATTGTTTGGGGGATTGGGAACGAGTTATG
 AATGAAGGTCCATGGACCTTTCGAGGATGTTCCGGTGCTCCTCGCAGAATATGATGGC
 15 TGGTCCAAGATTGAAT

La séquence d'ADN du marqueur M1 présente une taille de 471 pb.

L'invention vise encore, en tant que nouveaux
 20 produits, les séquences de nucléotides utilisées comme amorces d'amplification en PCR.

De telles amorces comprennent les couples E-AAC/M-CAG ; E-ACC/M-CAG ; E-ACC/M-CAG ; dans lesquels E
 25 et M correspondent respectivement à SEQ ID N° 1 et SEQ ID N° 2.

D'autres amorces encore sont complémentaires de séquences identifiées dans la séquence du fragment appelé
 30 marqueur M1. Il s'agit en particulier de séquences (5', 3') choisies parmi :

AGGAAGGGGAACACAACAGCC (21 pb) (SEQ ID N° 4)

TTATGCTGGAGGGGCTTGACC (21 pb) (SEQ ID N° 5)

5

GCAGTTCCATGCTGAGCGCAT (21 pb) (SEQ ID N° 6)

CCGAACATCCTCGAAAGGTCC (21 pb) (SEQ ID N° 7)

10

TCATATTCTGCGAGGAGCACC (21 pb) (SEQ ID N° 8)

15 Selon encore un autre aspect, l'invention vise l'utilisation des séquences d'ADN obtenues avec les amorces ci-dessus pour définir des polymorphismes permettant l'identification de phénotypes résistants.

20 L'invention concerne également un procédé d'identification de la séquence d'ADN portant le gène majeur de la résistance au RYMV. Ce procédé est caractérisé par le criblage d'une banque constituée de fragments d'ADN de 100 à 150 kb de la variété IR64 ou autre, tel que la banque BAC (Bacterial Artificial Chromosomes), clonés dans des bactéries, pour sélectionner le ou les clones de la banque renfermant les marqueurs définis ci-dessus et le gène de résistance au RYMV.

25

Une telle banque BAC est disponible auprès de l'IRRI.

30 L'existence de sites de restriction différents sur la séquence correspondant au marqueur M1 et notamment les sites correspondant à HpaII/McpI permet d'identifier avantageusement les phénotypes résistants.

L'identification de sites de restriction différents sur la séquence correspondant au marqueur M1 permet de caractériser un polymorphisme qui peut être exploité avantageusement pour cartographier le marqueur M1 sur les cartes de liaison génétique du riz.

La cartographie de la séquence correspondant au marqueur M1 permet d'identifier une zone chromosomique sur le chromosome 4 du riz portant le locus de résistance au RYMV.

D'autres caractéristiques et avantages de l'invention seront donnés dans les exemples qui suivent, dans lesquels il est fait référence aux figures 1 à 9 qui concernent respectivement,

- la figure 1 : le clonage du marqueur M1 dans le plasmide PGEMTeasy. La digestion du plasmide montre un fragment d'ADN de 510 pb correspondant à la bande M1 ;

- la figure 2 : l'amplification du marqueur M1 dans les quatre variétés de riz (Azucena, Gigante, IR64 et Tog5681) en utilisant les couples d'amorces
2-4) : 291 pb ; (2-5) : 310 pb ; (1-3) : 288 pb ;
(1-4) : 406 pb ; (1-5) : 425 pb ; (2-3). Le fragment M1 est légèrement plus grand chez Tog5681 que chez les autres variétés ;

- la figure 3 : l'identification de sites de restriction sur la séquence du marqueur M1 chez les 4 variétés IR64, Azucena, Gigante et Tog5681 ;

5 - la figure 4 : la digestion du marqueur M1 avec l'enzyme HpaII après amplification PCR en utilisant les couples d'amorces (1-3), (1-4) et (1-5) sur les quatre variétés (Azucena, Gigante IR64 et Tog5681). La présence d'un site de restriction HpaII dans les variétés
10 IR64 et Tog5681 libère un fragment de 86 pb qui réduit d'autant la taille du fragment amplifié ;

 - la figure 5 : la caractérisation du marqueur M1 sur les plantes sensibles et résistantes de la
15 descendance F2 (IR64 x Gigante). Les plantes F2 résistantes ont le profil du parent résistant (IR64-absence du site HpaII), à l'exception d'un seul recombinant, les plantes résistantes ont le profil du parent sensible (IR64-présence du site HpaII) à
20 l'exception de deux recombinants ;

 - la figure 6 : la ségrégation du marqueur M1 dans la population HD (IR64 x Azucena) : IR64-Azucena-30 individus HD (IR64 x Azucena) ;

25 - la figure 7 : la carte de liaison génétique du chromosome 4 du riz avec le positionnement du marqueur M1 et l'identification de l'intervalle dans lequel se trouve le locus de résistance ;

- la figure 8 : l'hybridation du marqueur M1 utilisé comme sonde sur des membranes portant l'ADN des 4 variétés (IR64, Azucena, Gigante et Tog5681) digérées par 6 enzymes de restriction ApaI, KpnI, PstI, ScaI, HaeIII. La variété Tog5681 présente un profil de restriction différent des autres variétés pour l'enzyme ScaI qui peut être utilisée pour marquer le locus de résistance de cette variété ; et

- la figure 9 : l'hybridation du marqueur M1 utilisé comme sonde sur des membranes portant l'ADN d'individus issus de recroisement (IR64 x Tog5681) x Tog5681 et digérés avec l'enzyme ScaI. Cette descendance est en ségrégation pour la résistance au RYMV. Les individus sensibles (5) montrent tous la bande d'IR64 associée à la bande de Tog5681 (individus hétérozygotes). Les individus résistants (9) ne montrent que la bande de Tog5681 à l'exception d'un individu recombinant.

Exemple 1 : Identification des variétés sources de résistance

Les variétés utilisées dans l'étude de la résistance et en particulier les deux variétés résistantes Gigante et Tog5681 ont été caractérisées grâce à des marqueurs microsatellites sur un échantillonnage représentatif de loci.

Le polymorphisme se manifeste par le nombre de répétitions d'un court motif nucléotidique, le plus souvent binucléotidique qui est caractéristique d'une variété donnée.

5 Sur un ensemble de loci, les allèles répertoriés permettent de disposer des caractéristiques spécifiques de chaque variété.

La mise en évidence de ces marqueurs microsatellites s'effectue par l'amplification de l'ADN
10 avec des amorces spécifiques déterminées par Chen et al.(1), suivie d'une migration sur gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes suivant le protocole décrit par les mêmes auteurs.

Le tableau 1 donne les résultats à partir d'un
15 système de référence établi par Chen et al., ci-dessus suivant lequel les allèles sont identifiés par le nombre de répétitions du motif comparativement à la variété IR36 qui sert de témoin. Les deux variétés Gigante et Tog5681 sont ainsi décrites spécifiquement sur 15 loci vis-à-vis
20 de toutes autres variétés (les marqueurs microsatellites sont donnés dans la 1ère colonne).

Tableau 1

Locus	Chr	Taille sur IR 36	référence	IR36	Gigante	IR64	Azucena	TOG 568113
RM001	1	113	(2)	n	n-26	n	n-22	n-26
RM005	1	113	(2)	n	n-6	n-4	n+16	n-8
RM011	7	140	(2)	n	n-4	n	n-24	n-16
RM018	7	157	(2)	n	n+4	n+6	n+8	n-6
RM019	12	226	(2)	n	n	n+21	n-9	n-21
RM021	11	157	(2)	n	n+8	n	n-14	n-32
RM148	3	129	(3)	n	n+6	n	n	n+6
RM167	11	128	(3)	n	n+4	n	n+32	n+24
RM168	3	116	(3)	n	n-20	n	n-20	n-24
RM232	3	158	(1)	n	n-14	n	n-12	n-16
RM022	3	194	(2)	n	n-2	n	n-4	n-2
RM252	4	216	(1)	n	n+38	n+2	n-20	n+10
RM255	4	144	(1)	n	n	n	n	n
RM246	1	116	(1)	n	n-12	n-12	n-16	n-12
RM231	3	182	(1)	n	n+6	n-22	n-4	n-12

Exemple 2 : Caractérisation de la résistance

5 La résistance a été caractérisée à partir de l'inoculation artificielle de jeunes plantules avec du virus comparativement à une variété témoin IR64 extrêmement sensible.

10 Le contenu en virus a été suivi pendant 60 jours après inoculation grâce à des tests ELISA sur les dernières feuilles émises.

 Ces tests n'ont jamais pu mettre en évidence de signal significativement différent de plantes témoins non inoculées par le virus.

15 Une autre expérimentation a été réalisée en inoculant des protoplastes isolés des deux variétés Tog5681 et Gigante. Dans les deux cas, il est possible de détecter la présence des protéines virales (protéine de la capsid et protéine de mouvement P1), ainsi que
20 l'accumulation d'ARN viral, qui témoignent de la capacité de ces protoplastes à multiplier le virus, et ceci de la même manière que les protoplastes de variétés sensibles comme IR64.

25 Ainsi, si on considère que la réplication, le mouvement de cellule à cellule, et le transport à longue distance à travers les vaisseaux, sont les trois étapes principales du déroulement du cycle infectieux dans la plante, la résistance de ces deux variétés réside le plus

logiquement dans un blocage du virus au niveau des cellules infectées.

Exemple 3 : Génétique de la résistance

5

Différents croisements F1 ont été réalisés entre la variété d'O. sativa résistante (Gigante), une variété d'O. glaberrima résistante Tog5681 (également identifiée par l'ADRAO) et la variété de référence très

10

sensible IR64 (sélectionnée à l'IRRI).
La culture du matériel végétal, les croisements et la production des descendance ont été réalisés dans les serres de l'IRD à Montpellier.

15

Les hybrides F1 obtenus entre les variétés sensibles et résistantes ont été testés pour la résistance au virus du RYMV par test ELISA et suivi des symptômes.

20

Ces hybrides F1 se sont tous révélés aussi sensibles que le parent sensible et ont donc montré que la nature de la résistance était récessive.

25

En revanche, les hybrides entre les deux sources de résistance Gigante et Tog5681 n'ont donné que des hybrides F1 résistants en faveur d'un seul et unique locus de résistance chez ces deux sources de résistance.

Ces résultats sont résumés dans le tableau 2 ci-après.

Ce tableau donne la distribution des réponses ELISA (A 405 nm) dans les feuilles infectées par voie systémique des hybrides F1, des backcross et des descendants F2 obtenus à partir des backcross entre la
5 variété IR64 sensible et les 2 cultivars résistants Gigante et Tog5681.

TABLEAU 2

descendances hybrides F1	Présence de	Nombre de	symptômes	génotypes	Distribution des valeurs de DO			Moyenne
					(0,01 - 0,05)	(0,9 -1)	>1	DO
Valeurs								
dérivés de Tog 5681								
F1 : (IR64 x Tog 5681)			Sensible	-	-	-	10	1,9
BCS:(IR64 x Tog 5681) x IR64			Sensible	19	-	4	15	1,6
BCG : (IR64 x Tog 5681) x Tog 5681 en ségrégation				22	12	-	10	-
Dérivés d'une plante fertile BCS								
BCSF2			sensible	11	-	-	11	1,3
BCS x IR64			sensible	1	-	-	1	1,9
BCS x Tog5681			sensible	15	-	-	15	1,9
dérivés de Gigante								
F1 : (IR64 x Gigante)				-	-	-	10	1,9
F2 : (IR64 x Gigante)			en ségrégation	65	15	-	50	-
F1 : (Gigante x Tog5681)			sensible	-	10	-	-	0,3

Les réponses ELISA sont obtenues à partir de :

- i) 10 plantes régénérées par bouturage pour chaque combinaison hybride F1
- ii) 1 plante régénérée pour chaque génotype interspécifique dérivé de backcross

iii) tests directs sur des plantules jeunes (inoculation à 10 jours après germination et temps de lecture à 7 jours après inoculation) pour les descendances interspécifiques F2 et fertiles

En ce qui concerne Gigante, l'hérédité de la résistance a été confirmée par un test de résistance sur 55 familles F3 du croisement (IR64 x Gigante). Les résultats sont donnés dans le tableau 3.

Ce tableau donne la ségrégation de la résistance à RYMV dans les descendances F3

(IR64 x Gigante). L'inoculation est effectuée 10 à 17 jours après la germination avec l'isolat du Burkina Faso et les symptômes sont suivis 45 jours après l'inoculation .

Tableau 3

Classes de résistance	Nombre de descendances	Nombre de plantes		Fréquence des plantes résistantes	
		Total	Sensible Résistant		
Sensible en ségrégation	15	191	191	0	0
	30	343	262	81	0,24
					$\chi^2 = 0,07 (3:1)$
Résistant très résistant	4	45	14	31	0,69
	6	87	0	87	1
Résistant* très résistant*	7	73	23	50	0,68
	4	56	0	56	1

* descendances F3 dérivées de plantes résistantes F2 analysées par tests ELISA

L'examen de ce tableau montre que :

- 5 - 1/4 de plantes F2 ne donne que des plantes résistantes dans les descendances F3, et sont homozygotes pour la résistance
- 1/4 de plantes F2 ne donne que des plantes sensibles dans les descendances F3, et sont homozygotes pour la sensibilité
- 10 - 1/2 des plantes F2 sont en ségrégation pour la résistance et donnent des plantes sensibles et résistantes avec la même proportion (3:1) dans les descendances F3.
- 15 L'ensemble des résultats s'accorde parfaitement avec un seul gène de résistance récessif présent chez les deux variétés Gigante et Tog5681.

20 Exemple 4 : Identification des marqueurs de résistance M1 et M2 selon le protocole AFLP

a - Obtention de pools d'ADN

 Les feuilles de 10 plantes sensibles et de 10 plantes résistantes issues d'une F2 (IR64 x Gigante) ont été prélevées pour extraire leur ADN.

25 Les ADN ont été ensuite mélangés de manière stoechiométrique pour constituer deux pools d'ADN

correspondant respectivement à 10 plantes F2 sensibles ou résistantes avec une concentration finale du mélange de 50 ng/ μ l. Ces mélanges ont servi de base à l'identification de marqueurs de résistance par la méthode AFLP (Amplified Fragments Length Polymorphism) pour polymorphisme de longueur de fragments amplifiés qui a été développée par Zabeau et al (4), et Vos et al.(5). Les produits utilisés se présentent sous forme d'un kit commercial (Gibco BRL) délivré par Keygene & Life Technologies.

b - Obtention de fragments de restriction

250 ng de chacun des pools d'ADN à 50 ng/ μ l et des parents sont digérés simultanément par deux enzymes de restriction (EcoRI et MseI).

Réaction de digestion (25 μ l) :

5 μ l d'ADN (50 ng/ml)

0,2 μ l (2 U) de EcoRI (10 U/ μ l)

0,2 μ l (2 U) de MseI (5 U/ μ l)

5 μ l de tampon T4 ligase 5X

14,5 μ l de H₂O.

La réaction de digestion s'effectue pendant deux heures à 37°C, puis 15 min. à 70°C pour inactiver les enzymes de restriction. Après digestion, il est procédé à une réaction de ligation.

5 Réaction de ligation (50 µl) :

25 µl du milieu réactionnel de double digestion

1 µl d'adaptateur EcoRI

1 µl d'adaptateur MseI

5 µl de tampon T4 Ligase 5X

10 1 µl (1 U) de ligase (10 U/µl)

17 µl H₂O.

La réaction de ligation s'effectue à 37°C, pendant 3 heures, suivie d'une inactivation de l'enzyme à 60°C pendant 10 min.

15 c - Amplification

L'amplification proprement dite a été réalisée en deux étapes : préamplification et amplification spécifique.

C1 - Réaction de pré amplification (50 µl)

20 5 µl du milieu réactionnel renfermant l'ADN digéré et fixé aux adaptateurs, dilué au 1/10

0,5 µl d'amorce EcoRI (150 ng/µl)

0,5 μ l d'amorce MseI (150 ng/ μ l)

2 μ l de mélange de nucléotides 5 mM

5 μ l de tampon 10 X, Promega

5 μ l de $MgCl_2$ 25 mM

5 0,2 μ l (1 U) de Taq polymérase (5 U/ μ l)

31,8 μ l de H_2O .

Les caractéristiques de la pré-amplification par PCR sont les suivantes :

10 20 cycles avec dénaturation : 30 sec à 94°C
 hybridation : 30 sec à 56°C
 élongation : 1 min à 72°C

15 L'amplification sélective se fait à partir d'un aliquote de la première amplification diluée au 1/30 en utilisant des amorces ayant 3 nucléotides sélectifs à l'extrémité 3', et en marquant l'une des amorces pour révéler les bandes sur un film autoradiographique.

On utilise les couples d'amorces suivants :

E-AAC/M-CAG

E-ACC/M-CAG

E-AGC/M-CAG,

5 dans lesquels

E répond à la séquence

GAC TGC GTA CCA ATT C (SEQ ID N°1), et

M à la séquence

GAT GAG TCC TGA GTA A (SEQ ID N° 2).

10 La température d'hybridation est diminuée de 0,7°C par cycle, pendant les 11 cycles suivants :

20 derniers cycles dénaturation : 30 sec à 90°C

hybridation : 30 sec à 56°C

15 élongation : 1 min à 72°C

On procède au marquage de l'amorce EcoRI (ramené à un tube de 0,5 µl) :

0,18 µl de l'amorce EcoRI (5ng)

20 0,1 µl de $\gamma^{33}\text{P}$ ATP (10 mCu/µl)

0,05 μ l de tampon kinase 10 X

0,02 μ l (0,2U) de T4 polymérase kinase (10U/ μ l)

0,15 μ l de H₂O.

La réaction de marquage se fait à 37°C pendant
5 1 heure et est arrêtée par 10 minutes à 70°C.

C2 - Réaction d'amplification spécifique

(20 μ l) :

0,5 μ l d'amorce EcoRI marquée

5 μ l du milieu réactionnel de pré-
10 amplification, dilué au 1/30,

0,3 μ l d'amorce MseI (100 ng/ μ l)

0,8 μ l de mélange de nucléotides 5 mM

2 μ l de tampon 10 X Promega

2 μ l de MgCl₂ 25 mM

15 0,1 μ l (0,5 U) de Taq polymérase (5 U/ μ l)

9,3 μ l de H₂O.

Les caractéristiques de l'amplification sont
les suivantes :

32 cycles avec

. pour le premier cycle :

dénaturation : 30 sec à 94°C

hybridation : 30 sec à 65°C

5 élongation : 1 min à 72°C

. les 11 cycles suivants : les mêmes conditions que précédemment, avec diminution à chaque cycle de 0,7°C de la température d'hybridation ; et pour

. les 20 derniers cycles :

10 dénaturation : 30 sec à 90°C

hybridation : 30 sec à 56°C

élongation : 1 min à 72°C

d - Electrophorèse et Autoradiographie

15 A la fin de la réaction d'amplification, 20 µl de tampon de charge sont ajoutés (98 % de formamide, 0,005 % de xylène cyanol et 0,005 % de bleu de bromophénol). Les produits d'amplification sont séparés par électrophorèse sur gel de polyacrylamide dénaturant (6 % d'acrylamide, 8 M d'urée) avec un tampon de
20 migration TBE (Tris 18 mM, EDTA 0,4 mM, acide borique 18 mM, pH 8,0) pendant 3 heures de migration à puissance de 50 watts. Après migration, le gel est fixé dans une solution 1V d'acide acétique/2V d'éthanol absolu pendant

20 minutes. Le gel est transféré sur un papier Wattman 3M et séché pendant 45 minutes à 80°C avec un sécheur de gel. Le gel est placé dans une cassette avec un film ultrasensible. L'autoradiographie est révélée après deux
5 jours d'exposition. La comparaison des profils obtenus chez les parents et les pools de plantes sensibles ou résistantes permet d'identifier des bandes présentes dans l'un des pools, mais absentes dans l'autre. Ces bandes candidates au marquage de la résistance sont ensuite
10 vérifiées individuellement sur chacune des plantes composant les pools d'ADN.

e - Résultats

L'étude des résultats obtenus montre que les
15 deux marqueurs appelés M1 et M2 sont présents chez le parent sensible (IR64) ainsi que dans toutes les plantes F2 (IR64 x Gigante) composant le pool de plantes sensibles, alors que cette bande est absente chez le parent résistant (Gigante) et qu'un seul individu du pool
20 résistant manifeste cette bande. Le même type de variation est observé dans le recroisement (IR64 x Tog5681) x Tog5681. Les autres marqueurs identifiés dans cette analyse (M3 à M6) montrent aussi la même variation:

25 - présence des bandes chez le parent sensible et le pool des plantes sensibles F2 (IR64 x Gigante) ainsi que

les plantes sensibles du recroisement (IR64 x Tog5681) x Tog5681.

- absence de bande chez les parents résistants Gigante et Tog5681, chez le pool des plantes résistantes F2 (IR64 x Gigante) et chez les plantes résistantes du recroisement (IR64 x Tog5681) x Tog5681.

Les données de ségrégation entre les marqueurs AFLP M1 à M6 et le locus de résistance pour les pools F2 (IR64 x Gigante) et le backcross interspécifique (IR64 x Tog5681) x Tog5681 sont résumées dans les tableaux 4 et 5. L'analyse des données de ségrégation et des rares recombinants observés dans les deux croisements permet d'évaluer les taux de recombinaison entre ces différents marqueurs et le locus de résistance. En particulier, les marqueurs M1 d'une part et les marqueurs M2 à M6 d'autre part déterminent un segment inférieur à 10-15 cM portant le locus de résistance. M1 et M2 sont ainsi à moins de 5-10 cM et placés de part et d'autre de ce locus.

Résistance / Marqueur M1		Nombre d'individus observés					
Phénotype	Génotype résistance RYMV Marqueur AFLP	Résistant			Sensible		
		<i>tt/gg</i> -/-	<i>tt</i> +/-	<i>gg</i> +/+	<i>lt</i> -/-	<i>lt</i> +/-	<i>ll</i> -/- <i>ll</i> +/+
Pool F2 résistant (IR64 x gigante)		10	-	1	-	-	-
Pool F2 sensible (IR64 x gigante)		-	-	-	-	-	0
Backcross interspécifique Tog5681		11	1	-	0	8	-

Résistance / Marqueur M2, M3, M4, M6		Nombre d'individus observés					
Phénotype	Génotype résistance RYMV Marqueur AFLP	Résistant			Sensible		
		<i>tt/gg</i> -/-	<i>tt</i> +/-	<i>gg</i> +/+	<i>lt</i> -/-	<i>lt</i> +/-	<i>ll</i> -/- <i>ll</i> +/+
Pool F2 résistant (IR64 x gigante)		11	-	0	-	-	-
Pool F2 sensible (IR64 x gigante)		-	-	-	-	-	0
Backcross interspécifique Tog5681		10	2	-	0	8	-

Résistance / Marqueur M5		Nombre d'individus observés					
Phénotype	Génotype résistance RYMV Marqueur AFLP	Résistant			Sensible		
		<i>tt/gg</i> -/-	<i>tt</i> +/-	<i>gg</i> +/+	<i>lt</i> -/-	<i>lt</i> +/-	<i>ll</i> -/- <i>ll</i> +/+
Pool F2 résistant (IR64 x gigante)		11	-	0	-	-	-
Pool F2 sensible (IR64 x gigante)		-	-	-	-	-	0
Backcross interspécifique Tog5681		9	3	-	0	8	-

Tableau 4.5 : Tableaux de contingence entre les marqueurs AFLP M1 à M6 et le locus de résistance pour les pools F2 (IR64 x Gigante) et le back cross interspécifique (IR64 x Tog5681) x Tog5681.

Tableau 4

Marqueur M1/Marqueurs M2, M3, M4, M6 Nombre d'individus observés

Génotype M1	+/*	+/*	-/-	-/-
Génotype M2, M3, M4, M6	+/*	-/-	+/*	-/-
Pool F2 résistant (IR64 x gigante)	0	1	0	10
Pool F2 sensible (IR64 x gigante)	10	0	0	0
Backcross interspécifique Tog5681	11	2	2	11

Marqueur M1/Marqueur M5 Nombre d'individus observés

Génotype M1	+/*	+/*	-/-	-/-
Génotype M5	+/*	-/-	+/*	-/-
Pool F2 résistant (IR64 x gigante)	0	1	0	10
Pool F2 sensible (IR64 x gigante)	10	0	0	0
Backcross interspécifique Tog5681	11	2	3	10

Marqueur M5/Marqueurs M2, M3, M4, M6 Nombre d'individus observés

Génotype M5	+/*	+/*	-/-	-/-
Génotype M2, M3, M4, M6	+/*	-/-	+/*	-/-
Pool F2 résistant (IR64 x gigante)	0	0	0	11
Pool F2 sensible (IR64 x gigante)	10	0	0	0
Backcross interspécifique Tog5681	13	1	0	12

* : (-) backcross interspécifique Tog5681, (+ ou -) pool F2

Tableau 4.6. Tableaux de contingence obtenus avec les marqueurs AFLP M1 à M6 dans les pools F (IR64 x Gigante) et le backcross interspécifique (IR64 x Tog56881) x Tog5681.

Tableau 5

Exemple 5 : Isolement du marqueur M1

Une nouvelle amplification, avec le même couple d'amorces, a été réalisée, suivie d'une migration sur gel de polyacrylamide dans les mêmes conditions que celles énoncées ci-dessus. La révélation a été faite par une coloration au nitrate d'argent, avec le kit silver staining (Promega), pour visualiser directement les bandes sur le gel. Après révélation, la bande M1 a été excisée du gel, puis l'ADN a été élué dans 50 μ l d'eau à 4°C pendant une nuit.

Un aliquot de 5 μ l a été prélevé et réamplifié avec les mêmes couples d'amorces avec un marquage au p^{33} .

Le produit d'amplification a été séparé à nouveau sur gel d'acrylamide dénaturant à 6%, et comparé aux parents et aux pools sensibles et résistants. La piste correspondant à ce produit d'amplification montre une seule bande de 510 pb migrant exactement au même niveau que la bande d'origine qui avait été excisée. Un autre aliquot de 5 μ l a été également amplifié avec les mêmes amorces et a été séparé sur gel d'agarose à 1,8%. La bande correspondant à la taille attendue (510pb) a été à nouveau excisée et purifiée avec un kit gene clean (Promega).

Exemple 6 : Clonage et Séquençage du MarqueurM1

5

. clonage

3 μ l du produit de purification ont été
utilisés pour une réaction de clonage pendant une nuit à
10 37°C.

3 μ l de produit de purification
1 μ l de vecteur PGEMTeasy
1 μ l de T4 Tampon ligase 10 X
15 1 μ l de T4 DNA Ligase
4 μ l de H₂O

La transformation a été réalisée avec la souche
E. Coli JM109 en ajoutant 5 μ l du produit de clonage à
20 100 μ l de cellules compétentes de *E. Coli* JM109. Une
préculture a été réalisée sur milieu de culture LB
pendant 1 heure, à 37 °C. Ensuite les bactéries ont été
étalées sur boîte de Pétri contenant de l'agar à 1/1000
d'ampicilline. 50 μ l d'IPTG-XGal sont ajoutés juste avant
25 l'étalement des bactéries pour sélectionner les bactéries
transformées. Une colonie blanche (transformée) a été
sélectionnée et remise en culture dans les mêmes
conditions (Agar plus ampicilline).

A partir de cette culture, une mini-préparation d'ADN plasmidique a été réalisée avec le kit Wizard plus (Promega). L'ADN plasmidique contenant l'insert a été digéré avec l'enzyme EcoRI pour vérifier la présence du marqueur M1. Un gel d'agarose à 1,8% a permis de vérifier la présence de la bande de 3 kb correspondant au plasmide et de la bande de 510 pb correspondant au marqueur M1 (photo 1).

10 . Séquençage

La séquence de l'insert (SEQ ID N° 3) est la suivante (5', 3') :

15 SEQ ID N° 3

	20	30	40	50	60	70
	GTGCTTGCTTATAGCACTACAGGAGAAGGAAGGGGAACACAACAGCCATGGCGAGCG					
20	AAGGTTCAACGTCGGAGAAACAGGCTGCGACGGGCAGCAAGGTGCCGGCGCGGATC					
	GGAGGAAGGAAAAGGAGGAAATCGAAGTTATGCTGGAGGGGCTTGACCTAAGGGCAG					
	ATGAGGAGGAGGATGTGGAATTGGAGGAAGATCTAGAGGAGCTTGAGGCAGATGCAA					
	GATGGCTAGCCCTAGCCACAGTTCATACGAAGCGATCGTTTAGTCAAGGGGCTTTCT					
	TTGGGAGTATGCGCTCAGCATGGAAGTGCAGCGAAAGAAGTAGATTTAGAGCAATGA					
25	AAGACAATCTGTTCTCGATCCAATTCAATTGTTTGGGGGATTGGGAACGAGTTATGA					
	ATGAAGGTCCATGGACCTTTCGAGGATGTTCCGGTGCTCCTCGCAGAATATGATGGCT					
	GGTCCAAGATTGAAT					

30 Les séquences correspondant aux amorces utilisées pour les amplifications AFLP ont été retrouvées et montrent que la bande correspond à un fragment de restriction (EcoRI - MseI).

En déduisant les séquences correspondant aux amorces, la taille réelle du fragment d'ADN de riz cloné est de 471 pb.

5 L'utilisation des différents couples d'amorces (1-3), (1-4), (1-5) d'une part et (2-3), (2-4), (2-5) d'autre part permet de valider le clonage de la bande AFLP M1. L'amplification de l'ADN des variétés utilisées dans les croisements avec ces amorces ne montre qu'une
10 seule bande. Le fragment correspondant à la variété Tog56581 est un peu plus important que celui des autres variétés (fig. 2).

15 Exemple 7 : Transformation de la séquence M1 en marqueur polymorphe

Un polymorphisme pour le marqueur M1 a été déterminé entre les parents de la population haploïde doublée (IR64 x Azucena). Cette population compte plus de
20 300 marqueurs répartis sur les 12 chromosomes du riz. Pour cela, on s'est appuyé sur les sites de restriction de la séquence du marqueur M1 déterminée sur le parent IR64 (fig. 3). Les amorces (1-3), (1-4) et (1-5) ont été utilisés pour amplifier l'ADN des parents des croisements
25 qui a ensuite été digéré par des enzymes de restriction. Le site de restriction HpaII/MspI libère un fragment de 86 pb lorsque l'amorce 1 est utilisée. Ce site est absent chez les variétés Gigante et Azucena. (fig. 4).

Le marqueur a été testé sur les individus F2 du pool sensible et du pool résistant du croisement (IR64 x Gigante). Tous les individus résistants ont le profil de la variété Gigante (absence du marqueur AFLP M1 associée à l'absence du site de restriction HpaII/MspI) à l'exception de l'individu (5.11). Les individus sensibles présentent le site de restriction HpaII/MspI à l'état homozygote comme la variété IR64 à l'exception de deux individus hétérozygotes qui sont recombinés (fig. 5).

La séquence du marqueur M1 que l'on peut amplifier par des amorces spécifiques correspond bien au marqueur AFLP M1. La digestion par l'enzyme HpaII/MspI permet de distinguer l'allèle venant du parent sensible (IR64) du parent résistant (Gigante).

Ces nouvelles données permettent de conforter la position du locus de résistance entre les marqueurs M1 et M2 et d'estimer les taux de recombinaison à $0,065 \pm 0,045$ pour la distance entre M1 et le locus de résistance et $0,11 \pm 0,047$ pour la distance entre les marqueurs M1 et M2.

Exemple 8 : Cartographie du marqueur M1

Soixante individus de la population (IR 64 x Azucena) ont été passés pour le marqueur M1 :

amplification avec les amorces (1-3) et digestion par l'enzyme HpaII/MspI, suivie d'une séparation des fragments sur un gel d'agarose à 2,5 %. La ségrégation du marqueur M1 est sans distorsion (fig. 6). Les résultats permettent de cartographier le marqueur M1 en utilisant un logiciel de cartographie (Mapmaker V3), qui permet de placer le marqueur M1 sur le chromosome 4 entre les marqueurs RG 163 et RG 214 (fig. 7). Cet intervalle représente la zone où se situe le locus de résistance au RYMV.

Exemple 9 : Marquage du locus de résistance de la variété Tog5681

La présence du site de restriction HpaII/MspI dans la variété Tog5681 ne permet pas d'utiliser la stratégie de l'exemple 8 pour vérifier que le marqueur M1 est aussi un marqueur de la résistance provenant de Tog5681. Aussi, les 4 variétés Azucena, Gigante, IR64 et Tog5681 ont été digérées avec 12 enzymes de restriction (BamHI, BglII, DraI, EcoRI, EcoRV, HindIII, ApaI, KpnI, PstI, ScaI, XbaI, HaeIII) pour identifier un polymorphisme de restriction en utilisant la séquence d'ADN du marqueur M1 comme sonde. L'enzyme ScaI permet d'identifier un polymorphisme entre IR64 et Tog5681 (fig. 8). Ce polymorphisme a été utilisé pour valider le marqueur M1 sur un croisement (IR64 x Tog5681) x IR64 en ségrégation pour la résistance. 5 individus sensibles de ce croisement ont été testés et montrent tous la

bande caractéristique d'IR64. Les 9 individus résistants ne montrent que la bande de Tog5681 à l'exception d'un seul qui est recombinant (fig. 9). Le polymorphisme de restriction mis en évidence par l'enzyme ScaI en utilisant le marqueur M1 comme sonde est donc bien lié au locus de résistance de Tog5681. L'analyse génétique et l'identification de marqueurs de résistance sont cohérentes pour considérer que le marqueur M1 cartographie bien le même locus de résistance chez les deux variétés Gigante et Tog5681.

Exemple 10 : Transfert de la résistance assistée par la marqueur M1.

On notera que pour la validation des marqueurs de résistance en sélection, on utilisera également avantageusement le matériel résultant des croisements d'une variété résistante telle que la variété Gigante avec IR64 afin d'introduire la résistance dans cette variété. Un tel matériel peut correspondre à différents stades de croisement. On dispose par exemple du stade BC2 (87,5% théorique du génome du parent récurrent IR64), mais qui comporte le fragment de chromosome de Gigante portant la résistance au virus. A chaque génération de croisement, la présence du gène a été vérifiée par une évaluation de la ségrégation de la résistance dans la descendance en autofécondation. Le contrôle des marqueurs sur les croisements et leurs descendance permet d'éprouver la valeur prédictive de la résistance par la

présence du fragment de chromosome portant le gène de résistance.

Références bibliographiques

(1) Chen, X. et al., (1997), Development of a
microsatellite framework map providing genome-wide
5 coverage in rice (*Oryza sativa* L) *Theor Appl Genet* 95 :
553-567.

(2) Panaud, O. et al., (1996), Development of
microsatellite markers and characterization of simple
10 sequence length polymorphism (SSLP) in rice (*Oryza*
sativa L) *Mol Gen Genet* 252 : 597-607.

(3) Wu K.S. et al., (1993), Abundance, polymorphism and
genetic mapping of microsatellites in rice. *Mol Gen Genet*
15 241 : 225-235.

(4) Zabeau et al., (1993), Selective restriction fragment
amplification : a general method for DNA fingerprinting.
EP 92402629.7.

20 (5) Vos et al., (1995), AFLP, a new technique for DNA
fingerprinting. *Nucleic Acids Research* 23: 4407-4414.

REVENDICATIONS

1/ Procédé pour l'identification de marqueurs
5 du locus d'un gène majeur de résistance à RYMV,
caractérisé en ce qu'il comprend

- l'amplification sélective de fragments d'ADN
de riz d'une part d'individus résistants, d'autre part
d'individus sensibles, descendant de variétés parentales,
10 ces fragments ayant été préalablement soumis à une étape
de digestion, puis de ligation pour fixer des adaptateurs
complémentaires d' amorces ayant, à leur extrémité, un ou
plusieurs nucléotides spécifiques, l'une des amorces du
couple étant marquée aux fins de révélation,

15 - la séparation des produits d'amplification,
par électrophorèse sur gel dans des conditions
dénaturantes, et

- la comparaison des profils d'électrophorèse
obtenus avec des mélanges de fragments issus de
20 descendants résistants et des mélanges issus de
descendants sensibles, avec les fragments provenant des
variétés parentales, aux fins d'identification de bandes
dont le polymorphisme est génétiquement lié au locus de
résistance, cette identification étant suivie le cas
25 échéant, à titre de validation, d'une vérification sur
chacun des individus et du calcul du taux de
recombinaison génétique entre le marqueur et le locus de
résistance.

2/ Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce que les fragments d'ADN sont obtenus par digestion des ADN génomiques de plantes résistantes d'une part, et de plantes sensibles d'autre part, et de leurs parents, à l'aide d'enzymes de restriction.

3/ Procédé selon la revendication 2, caractérisé en ce qu'on utilise, comme enzymes de restriction, EcoRI et MseI.

4/ Procédé selon la revendication 2 ou 3, caractérisé en ce que les fragments de restriction sont soumis à une ligation pour fixer des adaptateurs.

5/ Procédé selon la revendication 4, caractérisé en ce que les fragments obtenus sont amplifiés à l'aide de couples d'amorces complémentaires des adaptateurs dont les séquences sont respectivement GAC TGC GTA CCA ATT C (SEQ ID N° 1) et GAT GAG TCC TGA GTA A (SEQ ID N° 2).

6/ Procédé selon la revendication 4 ou 5, caractérisé en ce que les fragments obtenus sont amplifiés à l'aide de couples d'amorces possédant à leur extrémité, respectivement, des motifs AAC et CAG, ACC et CAG, ou encore AGC et CAG.

7/ Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 6, caractérisé par l'identification de bandes marqueurs de résistance, M1 et M2, présentant

respectivement des tailles de 510 pb et 140 pb, telles que déterminées en électrophorèse sur gel en conditions dénaturantes.

5 8/ Procédé selon la revendication 7, caractérisé en ce que lesdites bandes marqueurs déterminent un segment inférieur à 10-15 cM portant le locus de résistance.

10 9/ Procédé selon la revendication 8, caractérisé en ce que lesdites bandes marqueurs sont situées de part et d'autre du locus et à moins de 5-10 cM.

15 10/ Procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 9, caractérisé en ce qu'il comprend en outre une étape d'isolement des bandes marqueurs identifiées.

11/ Procédé selon la revendication 10, caractérisé par la purification des bandes marqueurs isolées afin de disposer de fragments d'ADN.

20 12/ Procédé selon la revendication 11, caractérisé par le clonage des bandes marqueurs dans un vecteur et l'introduction du vecteur dans une cellule hôte.

25 13/ Procédé selon l'une quelconque des revendications 11 ou 12, caractérisé par la récupération et le séquençage des fragments d'ADN purifiés, clonés.

14/ Procédé d'obtention de marqueurs de grande spécificité vis-à-vis du locus d'un gène majeur de résistance au RYMV, caractérisé en ce qu'on définit des

couples d'amorces PCR complémentaires de la séquence du fragment cloné, on procède à une amplification spécifique de ce fragment à l'aide de ces couples d'amorces, puis on soumet les produits d'amplification à une migration sur gel d'électrophorèse précédée ou non d'une digestion par enzyme de restriction pour identifier un polymorphisme.

15/ Bandes AFLP polymorphes telles qu'identifiées par le procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 14 à partir d'ADN de plantes de riz.

10 16/ Bandes AFLP selon la revendication 15, caractérisées en ce qu'elles sont spécifiquement mises en évidence dans une variété sensible au RYMV, et dans la fraction de plantes sensibles issues du croisement de cette variété avec une variété résistante.

15 17/ Séquences d'ADN correspondant aux bandes polymorphes selon la revendication 15 ou 16, et qui permettent de définir un segment du chromosome 4 de 10-15 cM portant le locus de résistance au RYMV.

20 18/ Séquences d'ADN selon la revendication 17, caractérisées en ce qu'elles correspondent à des fragments EcoRI-MseI.

25 19/ Séquences d'ADN selon la revendication 18, caractérisées par une taille respectivement, de 510 pb et de 140 pb en gel d'électrophorèse en conditions dénaturantes.

20/ Séquences d'ADN selon l'une quelconque des revendications 17 à 19, caractérisées en ce qu'elles

correspondent à des séquences flanquant le locus de résistance et situées de part et d'autre de ce dernier, à 5-10 cm.

5 21/ Séquence d'ADN, caractérisée en ce qu'elle répond à SEQ ID N° 3.

 22/ Vecteurs de clonage, caractérisés en ce qu'ils comportent la séquence SEQ ID N°3 selon la revendication 21.

10 23/ Cellules hôtes, caractérisées en ce qu'elles sont transformées par des vecteurs selon la revendication 22.

 24/ Utilisation des bandes polymorphes selon la revendication 15 ou 16 ou des séquences d'ADN selon l'une
15 quelconque des revendications 17 à 21 pour l'identification de phénotypes résistants et le transfert du gène de résistance.

 25/ Utilisation des bandes polymorphes selon la revendication 15 ou 21 pour cartographier le gène de
20 résistance au RYMV sur une carte de liaison génétique.

 26/ Utilisation de SEQ ID N°3 selon la revendication 22 pour l'identification et le transfert de la résistance dans les variétés sensibles par sélection assistée par marqueur.

LISTE DE SEQUENCES

<110> I.R.D.
A.D.R.A.O.

<120> MOYENS POUR L'IDENTIFICATION DU LOCUS D'UN GENE MAJEUR
DE LA RESISTANCE AU VIRUS DE LA PANACHURE JAUNE DU RIZ
ET LEURS APPLICATIONS.

<130> CP/VB 926

<140>

<141>

<160> 8

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 16

<212> ADN

<213> nucléotide

<400> 1

gactgcgatc caattc

16

<210> 2

<211> 16

<212> ADN

<213> nucléotide

<400> 2

gatgagtcct gagtaa

16

<210> 3

<211> 471

<212> ADN

<213> nucléotide

<400> 3

gtgcttgctt atagcactac aggagaagga aggggaacac aacagccatg gcgagcgaag 60
gttcaacgtc ggagaaacag gctgcgacgg gcagcaaggt gccggcgggc gatcgaggga 120
aggaaaagga ggaaatcgaa gttatgctgg aggggcttga cctaaggga gatgaggagg 180
aggatgtgga attggaggaa gatctagagg agcttgaggc agatgcaaga tggctagccc 240
tagccacagt tcatacgaag cgatcggtta gtcaaggggc tttctttggg agtatgcgct 300
cagcatggaa ctgcgcgaaa gaagtagatt tcagagcaat gaaagacaat ctgttctcga 360
tccaattcaa ttgtttgggg gattgggaac gagttatgaa tgaaggtcca tggacctttc 420
gaggatgttc ggtgctcctc gcagaatatg atggctggtc caagattgaa t 471

<210> 4

<211> 21

<212> ADN

<213> nucléotide

<400> 4

aggaagggga acacaacagc c

21

<210> 5

<211> 21

<212> ADN

<213> nucléotide

<400> 5
ttatgctgga ggggcttgac c

21

<210> 6
<211> 21
<212> ADN
<213> nucléotide

<400> 6
gcagttccat gctgagcgca t

21

<210> 7
<211> 21
<212> ADN
<213> nucléotide

<400> 7
ccgaacatcc tcgaaaggtc c

21

<210> 8
<211> 21
<212> ADN
<213> nucléotide

<400> 8
tcatattctg cgaggagcac c

21

LISTE DE SEQUENCES

<110> I. R. D.

A. D. R. A. O.

<120> MOYENS POUR L' IDENTIFICATION DU LOCUS D' UN GENE MAJEUR
DE LA RESISTANCE AU VIRUS DE LA PANACHURE JAUNE DU RIZ
ET LEURS APPLICATIONS.

<130> CP/V B 926

<140>

<141>

<160> 8

<170> PatentIn Ver. 2.1

<210> 1

<211> 16

<212> ADN

<213> nucléotide

<400> 1

gactgcgatc caattc

16

<210> 2

<211> 16

<212> ADN

<213> nucléotide

<400> 2

gatgagtcct gagtaa

16

<210> 3

<211> 471

<212> ADN

<213> nucléotide

<400> 3

gtgcttgctt atagcactac aggagaagga aggggaacac aacagccatg gcgagcgaag 60
gttcaacgctc ggagaaacag gctgcgacgg gcagcaagggt gccggcgggcg gatcggagga 120
aggaaaagga ggaaatcgaa gttatgctgg aggggcttga cctaagggca gatgaggagg 180
aggatgtgga attggaggaa gatctagagg agcttgaggc agatgcaaga tggctagccc 240
tagccacagt tcatacgaag cgatcgttta gtcaaggggc tttctttggg agtatgcgct 300
cagcatggaa ctgcgcgaaa gaagtagatt tcagagcaat gaaagacaat ctgttctcga 360
tccaattcaa ttgtttgggg gattgggaac gagttatgaa tgaaggtcca tggaccttc 420
gaggatgttc ggtgctcctc gcagaatatg atggctggtc caagattgaa t 471

<210> 4
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> nucléotide

<400> 4
 aggaagggga acacaacagc c 21

<210> 5
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> nucléotide

<400> 5
 ttatgctgga ggggcttgac c 21

<210> 6
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> nucléotide

<400> 6
 gcagttccat gctgagcgca t 21

<210> 7
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> nucléotide

<400> 7
 ccgaacatcc tcgaaaggtc c 21

<210> 8
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> nucléotide

<400> 8
 tcatattctg cgaggagcac c 21

Figure 1

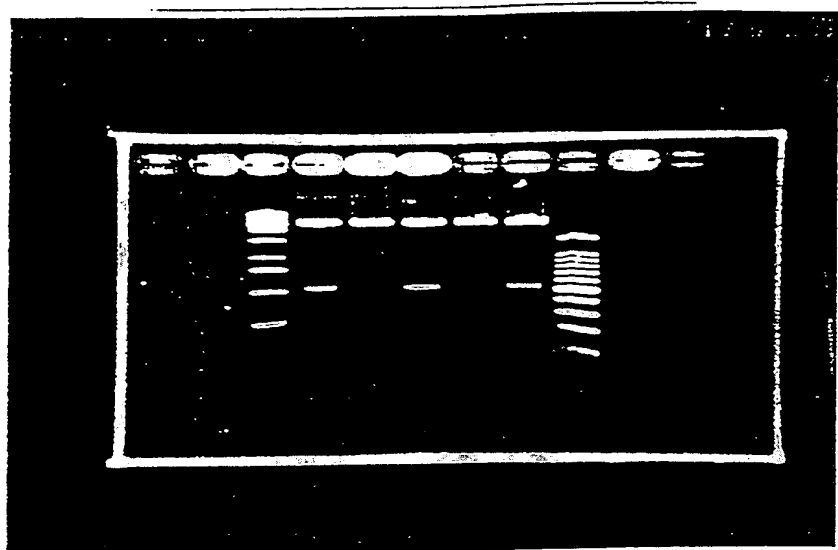
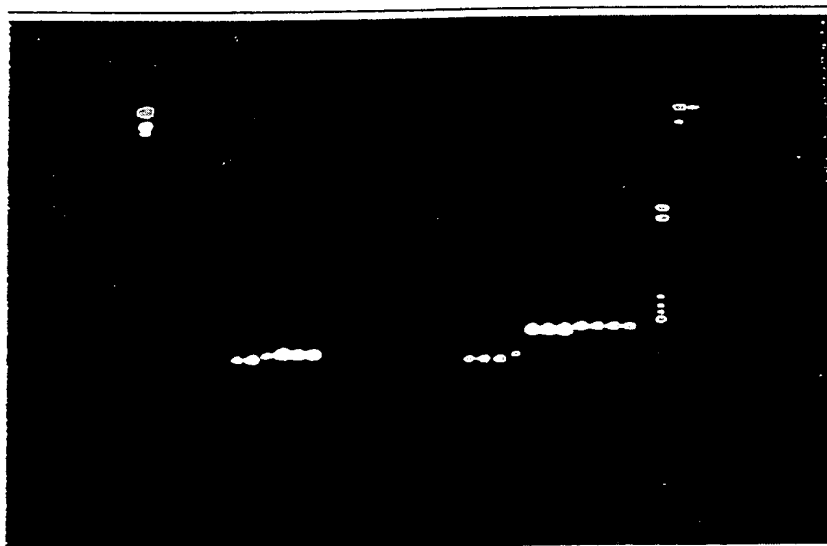


Figure 2



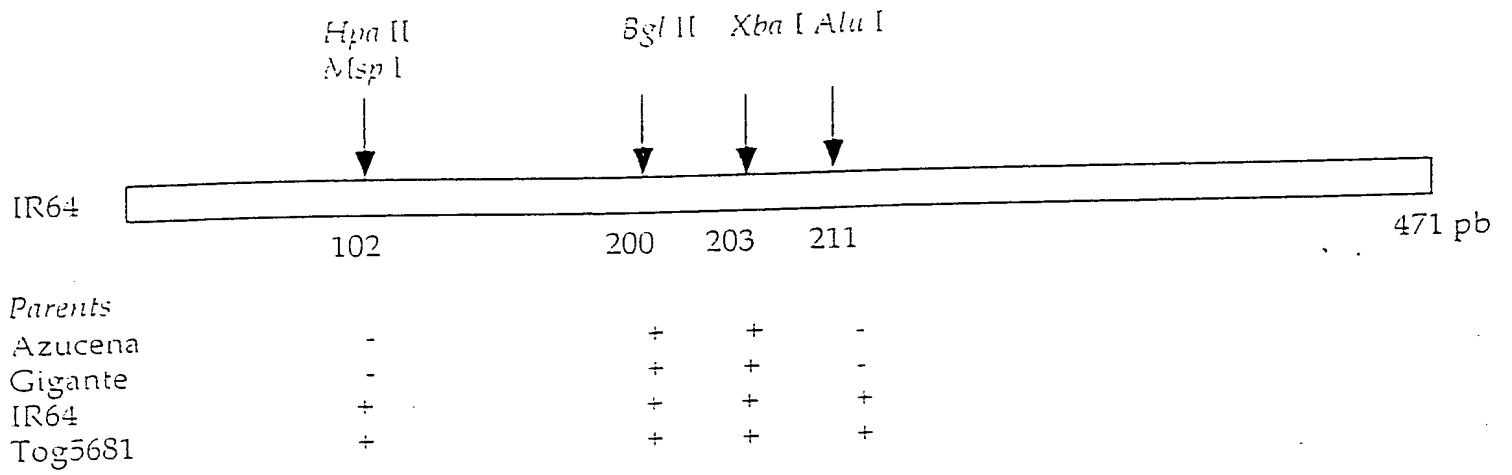
Figure 3

Figure 4

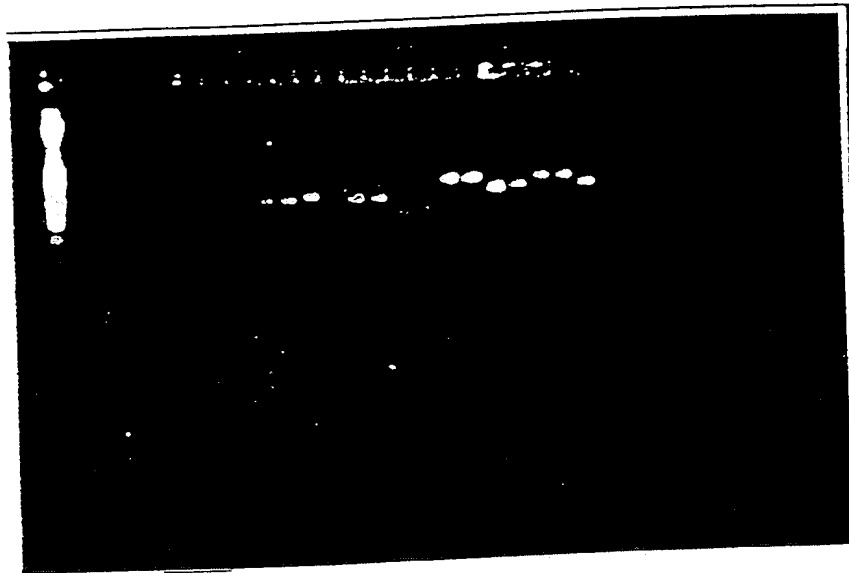


Figure 5

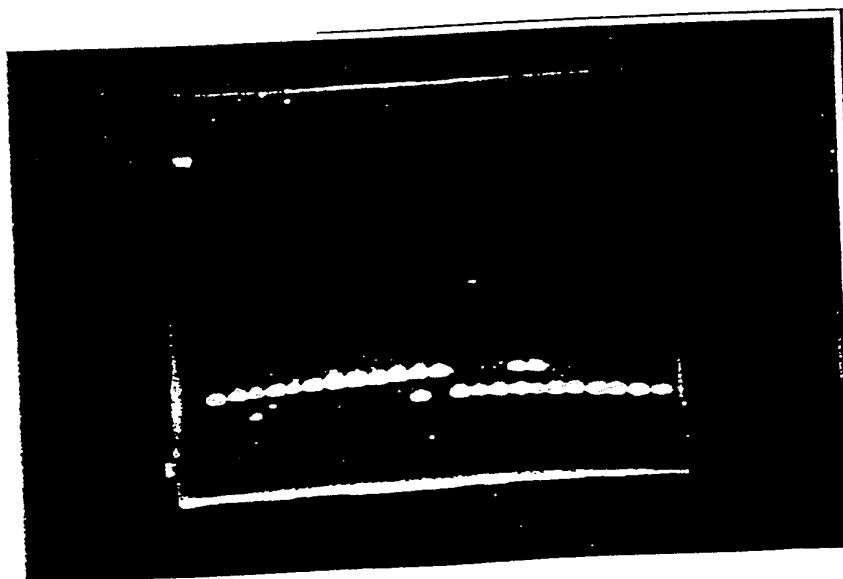
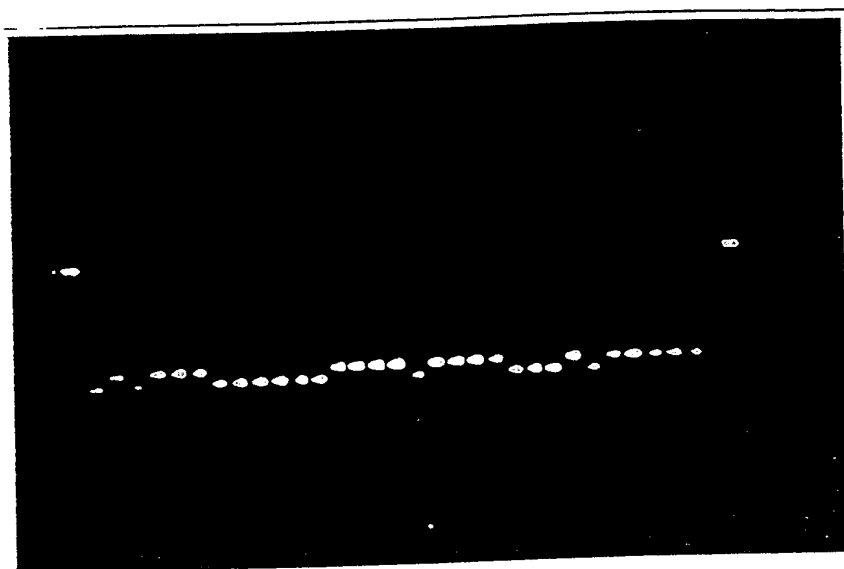


Figure 6



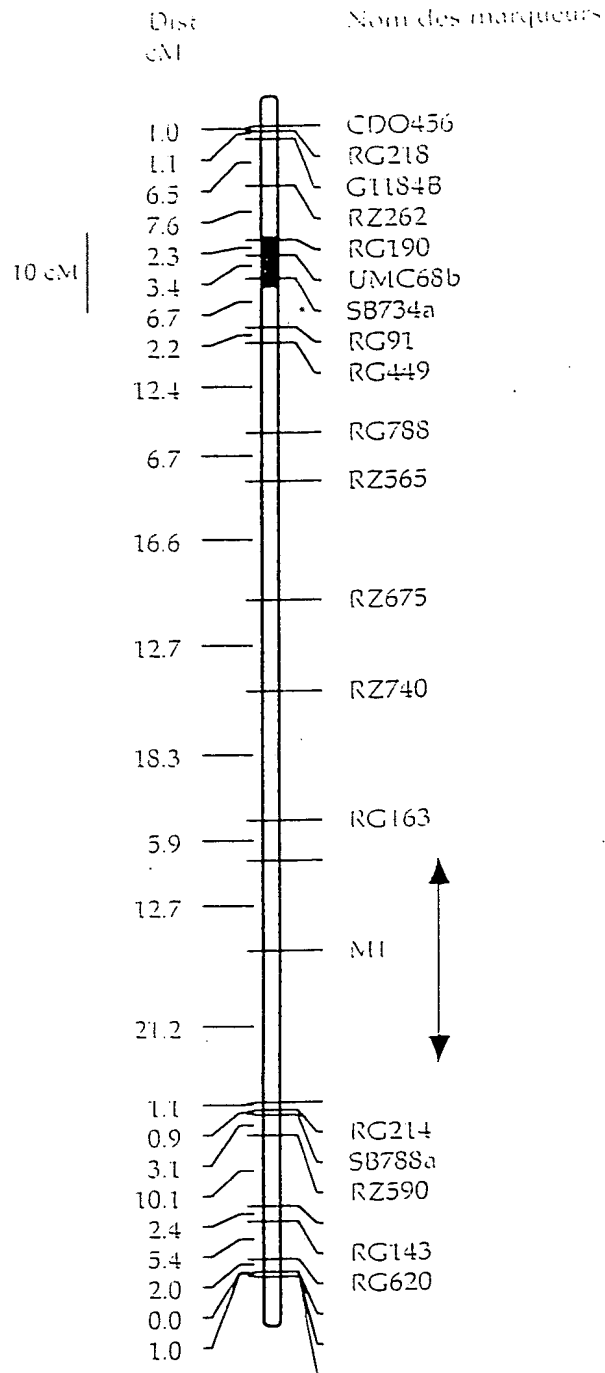


Figure 7

Figure 8

Figure 9

REPL

OSTRIELLE

THIS PAGE BLANK (USPTO)